Aus dem bakteriol. Laboratorium des eidgenöss. Polytechnikums Zürich.

Einwirkung von Mikroorganismen

auf

einige chemische Normallösungen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

mathematisch-naturwissenschaftlichen Sektion

der

hohen philosophischen Fakultät der Universität Zürich

von

Heinrich Beck

aus Frankfurt a. M.

Begutachtet von den Herren Prof. Dr. A. Dodel und Prof. Dr. O. Roth.

Jena,

Gustav Fischer

1902.

Aus dem Institut für Lebensmittelchemie der Universität Bonn

Aus dem bakteriol. Laboratorium des eidgenöss. Polytechnikums Zürich.

Einwirkung von Mikroorganismen

auf

einige chemische Normallösungen.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

mathematisch-naturwissenschaftlichen Sektion

der

hohen philosophischen Fakultät der Universität Zürich

von

ACAD. LAUSANNE BIBL.

Heinrich Beck
aus Frankfurt a. M.

Begutachtet von den Herren Prof. Dr. A. Dodel und Prof. Dr. O. Roth.

Jena,
Gustav Fischer
1902.

Diese Arbeit wurde im bakteriologischen Laboratorium des Eidgen. Polytechnikums angefertigt. Es sei mir gestattet, meinem hochverehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. O. Roth, meinen herzlichsten Dank für das freundliche Entgegenkommen und das Interesse, welches er mir widmete, auszusprechen.

Den Anstoß zu vorliegender Arbeit gab eine im bakteriologischen Laboratorium gelegentlich der Aufbewahrung verdünnter Lunge-Zeckendorff'scher Lösung gemachte Beobachtung.

Wie ich später zeigen werde, hatte sich eine solche Lösung nach verhältnismäßig kurzer Zeit entfärbt.

Gewisse Beobachtungen legten die Vermutung nahe, daß hierbei die Einwirkung von Mikroben eine Rolle spiele.

Auf Veranlassung des Herrn Prof. Roth hin habe ich nun diese Frage näher studiert und meine Aufgabe insofern erweitert, als ich auch andere Normallösungen miteinbezogen habe.

Bei dem Studium der diesbezüglichen Litteratur ist es mir aufgefallen, wie wenig Angaben zu finden sind über die allfälligen Veränderungen von aufbewahrten Titreflüssigkeiten durch Mikroben. Es hat dies wohl seinen Grund mit darin, daß den meisten praktischen Chemikern, die mit solchen Lösungen arbeiten, bislang die bakteriologischen Untersuchungsmethoden nicht geläufig waren.

Einschlägige Arbeiten, die ich in der sehr zerstreuten Litteratur auffinden konnte, beziehen sich eigentlich fast nur auf Oxalsäure, welche ich auch bei meinen Untersuchungen besonders berücksichtigte, indem ich die bereits erschienenen Arbeiten einer Nachprüfung unterzog und in mir nötig erscheinender Weise ergänzte.

Die Untersuchungen über das Lunge-Zeckendorff'sche Reagens schicke ich hier voraus.

In der hygienischen Praxis findet die Lunge-Zeckendorff'sche Methode[1]) häufige Verwendung, um den CO_2-Gehalt der Luft bewohnter Räume auf einfache und auch dem Nichtchemiker zugängliche Weise zu bestimmen.

Dieselbe beruht auf der Entfärbung einer sehr verdünnten, mit Phenolphtaleïn gefärbten Sodalösung von bestimmter Konzentration durch die Kohlensäure der Luft.

Das Reagens wird folgendermaßen bereitet. 5,3 g reine, wasserfreie Soda oder 14,3 $Na_2CO_3 + 10\ H_2O$ werden unter Zufügung von 0,1 g[2]) Phenolphtaleïn im Wasser aufgelöst und nach erfolgter Lösung zum Liter

1) Zeitschr. f. angewandte Chemie. 1888. Heft 14 und 1889. Heft 1.

2) In den Originalmitteilungen des Herrn Prof. Lunge findet sich eine Phenolphtaleïnzugabe von 1‰ angegeben. In Lehmann's Methoden der praktischen Hygiene. 2. Aufl. p. 139 ist ein Zusatz von 0,1 g Phenolphtaleïn pro Liter Stammlösung empfohlen.

Bei Herstellung meiner Lösungen befolgte ich letztere Vorschrift, da ich annahm, daß sie in allgemeinem Gebrauch sei.

ergänzt. Es entsteht eine dunkelrot gefärbte Flüssigkeit. Diese stellt die Stammlösung dar, welche sich in gut verschlossenen Flaschen monatelang halten soll. Unmittelbar vor Gebrauch giebt man 2 ccm obiger Vorratslösung zu 100 ccm frisch ausgekochtem, kohlensäurefreiem Wasser, welches man nach der Vorschrift darstellt, indem man destilliertes Wasser eine Zeit lang kocht und dann verschlossen erkalten läßt. Hiervon füllt man 10 ccm in den Apparat, der aus einem kleinen, ca. 50 ccm haltigen Glasgefäß besteht, dessen Hals mit einem festschließenden Gummistopfen versehen ist, durch welchen zwei Glasröhren einführen.

Eine derselben reicht bis fast auf den Boden der Flasche und steht mit einem mit Ventilen versehenen Gummiballon in Verbindung. Die Flasche muß vor dem Versuche mit der zu untersuchenden Luft gefüllt werden. Nun läßt man durch langsames aber vollständiges Zusammenpressen des Ballons — dessen Rauminhalt natürlich bekannt ist — die zu untersuchende Luft durch das Reagens strömen. Hierauf wird je 1 Minute lang geschüttelt und dann wiederum Luft durchgeleitet. Man setzt dies solange fort, bis Entfärbung der Lösung eintritt[1]). Eine dem Apparate beigegebene Tabelle gestattet es, den CO_2-Gehalt der geprüften Luft direkt aus der Anzahl der zur Entfärbung notwendig gewesenen Ballonfüllungen abzulesen.

Während also das Verfahren an sich an Einfachheit nichts zu wünschen übrig läßt, ist es doch gelegentlich für den praktischen Hygieniker — z. B. für den auf der Reise befindlichen Fabrikinspektor — nicht immer leicht, sich frisch bereitetes CO_2-freies Wasser zu beschaffen, auch steht demselben für die Vornahme der Verdünnung und Abmessung der Lösung nicht immer ein genügend kohlensäurefreier Raum zur Verfügung. Finden diese Operationen aber in dem Versuchsraume selbst statt, so ist hierdurch schon eine erhebliche Fehlerquelle gegeben. Herr Professor Roth hatte deshalb versucht, die jeweilen für eine Bestimmung nötigen 10 ccm der verdünnten Gebrauchslösung in kleine Fläschchen von ebenso viel Inhalt einzufüllen und in denselben — vor Luftzutritt geschützt — für späteren Gebrauch aufzubewahren.

Der Verschluß wurde durch gut schließende Korken mit Paraffinüberzug bewerkstelligt, um eine Einwirkung der Kohlensäure des Aufbewahrungsraumes vollständig auszuschließen.

Trotzdem zeigte es sich, daß nach einiger Zeit die Lösung anfing, sich zu entfärben. Es fand dieser Vorgang aber nicht in allen Fläschchen gleichzeitig statt, sondern es waren schon einige ganz entfärbt, während andere erst eine hellere Farbe angenommen hatten.

Als dann ein Fläschchen mit der entfärbten Lösung bakteriologisch untersucht wurde, fanden sich sehr viele Bakterien, die sich bei näherer Untersuchung hauptsächlich als Bacillus fluorescens liquefaciens erwiesen. Die Möglichkeit einer Bakterienwirkung war also gegeben.

Es schien mir daher angezeigt, die Frage zu prüfen, ob dieses Bakterienwachstum mit der Veränderung der erwähnten Lösung in Zusammenhange stehe, zu welchem Zwecke ich folgende Untersuchungen anstellte.

Vorerst untersuchte ich den Rest der vorhin erwähnten Fläschchen auf Pilze und fand in sämtlichen Bacillus fluorescens lique-

1) Bei aus älteren Stammlösungen hergestellten Gebrauchsflüssigkeiten tritt der Umschlag von rot in gelblich ein. Bei Lehmann, Praktische Hygiene, ist dies als Endresultat angegeben.

faciens vor. Schimmelmycel konnte ich nirgends bemerken, trotzdem wuchsen auf einigen Platten reichlich Kolonieen von Penicillium glaucum, welcher Schimmel wohl in Form nicht zur Auskeimung gelangter Konidien in der Lösung gewesen war.

Da ich in allen untersuchten Fläschchen fast nur Bacillus fluorescens liquefaciens vorgefunden hatte, glaubte ich meine ferneren Versuche ausschließlich mit diesem machen zu sollen. Es fragte sich nun, wie die Infektion der Fläschchen zustande kam. Wenn man das Wasser, welches zur Verdünnung der Stammlösung dienen soll, einige Zeit gekocht hat und mit Gummipfropfen erkalten läßt (wie ja auch die Vorschrift lautet), so dürfte, da die in Frage kommende Bakterienart keine Sporen bildet, dieser Bacillus sicher abgetötet sein. Durch das zur Verdünnung dienende Wasser konnte also die Lösung nicht infiziert werden. Ebenso ergab die Untersuchung, daß die zur Bereitung des verdünnten Reagens dienende Stammlösung kein Fluorescens liquefaciens enthielt. Da dieser jedoch zu den allerhäufigsten Wasserbakterien gehört und auch in anderen Medien keineswegs selten vorkommt, so ist seine Anwesenheit im Reagens nicht schwer erklärlich, falls nicht überall trockene, sterile Gefäße zur Anwendung gelangen, da z. B. die in den Flaschen befindlichen Reste des zur Reinigung dienenden Wassers genannte Bacillen enthalten können. Daß in chemischen Laboratorien ein Sterilisieren von Geräten und Flaschen aber nicht gebräuchlich, ist bekannt.

Um nun Bakterienwirkung nach Möglichkeit auszuschließen, füllte ich frisch bereitete Lunge-Zeckendorff'sche Gebrauchslösung in Reagensröhren ein, die vorher sterilisiert waren. Die Röhrchen wurden vor dem Einfüllen der Lösung samt dem Wattepfropfen in üblicher Weise im Trockenschrank sterilisiert und nach demselben $^3/_4$ Stunden dem strömenden Dampfe ausgesetzt. Nach dem Erkalten (vor dem Fenster) wurden die Wattepfropfen etwas weiter in die Röhrchen hineingeschoben und der leere Raum bis zum Rande der Röhrchen mit Paraffin zugegossen.

Am nächsten Tage waren einige Röhrchen entfärbt; nach 5 Tagen alle.

Durch die Plattenmethode konnte ich die Sterilität der Röhrchen feststellen. Da ich durch die Art des Verschlusses das Eindringen von Kohlensäure aus der umgebenden Luft ausgeschlossen glaubte, so dachte ich an die Möglichkeit einer eingeleiteten Zersetzung des Phenolphtaleïns durch die Soda beim Kochen. Es stellte sich jedoch heraus, daß alles Phenolphtaleïn noch vorhanden war, daß jedoch die Flüssigkeit durch Aufnahme von CO_2 genanntem Indikator gegenüber nicht mehr alkalisch reagierte. Es trat wieder Rotfärbung ein auf Zusatz einer Spur von Natronlauge.

Es erscheint unwahrscheinlich, daß bei wirklich luftdichtem Verschluß der Röhrchen die Lösung sich auf diese Weise entfärben konnte.

Wenn man jedoch erwägt, welche geringe Menge Soda in den 10—15 ccm jedes Röhrchens enthalten sind und welche geringe Menge CO_2 nötig ist, um die Entfärbung darin herbeizuführen, wurde es mir wahrscheinlich, daß die Spuren Luft, die sich in dem Wattebausch befanden, an der Entfärbung schuld waren. War es doch nicht ausgeschlossen, daß die umgebende Luft beim Auftropfen des Paraffins sehr kohlensäurehaltig war wegen der sich in der Nähe befindenden Flammen. Ich will hier noch bemerken, daß das Abbrennen des Wattebausches, wie dies in bakteriologischen Laboratorien üblich ist, um ein

Miteinbringen von anhängenden Keimen zu verhindern, die Entfärbung der Lösung in kürzester Zeit herbeigeführt werden kann. Ich unterließ deshalb dieses Ansengen der Wattepfropfen. Der mit Paraffin abgedichtete Watteverschluß erwies sich also als ungeeignet und ich versuchte den Verschluß mit Korken. Dieselben wurden vorher in Wasser ausgekocht und so die in den Poren befindliche Luft möglichst vollständig entfernt. Der Verschluß wurde in der Weise bewerkstelligt, daß ich die noch von der Sterilisation im Dampftopf heißen Röhrchen mit den gut schließenden, wie oben angegeben behandelten Korken verschloß, dann mit Paraffin überkleidete und einen Teil davon ungeimpft aufbewahrte. Die ca. 3 Wochen aufbewahrten Lösungen erwiesen sich später bei ihrer Untersuchung als völlig unverändert.

Ein anderer Teil der keimfrei gemachten Lösung wurde nun mit Bacillus fluorescens liquefaciens geimpft und nebst den Kontrollröhrchen teils bei 22° C, teils bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Beimpfung geschah durch Einbringen einer geringen Menge Agar-Fluorescenskultur, welche aus Lunge'schem Reagens gezüchtet war. Es wurde darauf gesehen, daß kein Nährboden mit in die Lösung gebracht wurde.

Es handelte sich nun darum, ob die ganz oder teilweise entfärbten Lösungen noch für die Luftuntersuchung zu verwenden seien, vielleicht in der Weise, daß durch einen Zusatz von einigen Tropfen Phenolphtaleïn die rote Farbe wiederhergestellt würde. Dies wäre wohl angängig, wenn, was ich in erster Linie annahm, eine Zerstörung (Reduktion?) des Farbstoffes die Schuld an der Entfärbung getragen hätte.

Daß dies in der That unter Umständen der Fall sein kann, beweist mir der Umstand, daß bei der in der Einleitung erwähnten, früher beobachteten Veränderung der Lösung die Veränderung des Indikators eine Rolle gespielt hatte, was daraus hervorging, daß ein weiterer Zusatz von Phenolphtaleïnlösung die Farbe wiedererscheinen ließ. Es zeigte sich jedoch, daß bei meinen Versuchen in den beimpften Lösungen das Phenolphtaleïn nicht verschwunden war, sondern daß das Reagens seine Alkalität verloren hatte, d. h. gegenüber Phenolphtaleïn; gegen Lackmus reagierte es noch alkalisch.

Es war also hier von einer praktischen Verwertung nicht die Rede.

Um nun festzustellen, ob Bacillus fluorescens liquefaciens überhaupt imstande ist, Phenolphtaleïn zu zerstören, machte ich folgende Versuche.

I. Nährgelatine wurde so stark mit Na-Lauge alkalisch gemacht, daß sie durch Phenolphtaleïn rot gefärbt wurde. Das Phenolphtaleïn verrieb ich zum Zwecke der Löslichmachung mit einigen Kubikcentimetern $^1/_1$ N-Lauge in einer Reibschale und filtrierte durch ein kleines Filter 2—3 Tropfen dieser Lösung zur alkalisch gemachten Gelatine. Hierauf wurde sterilisiert.

II. Peptonwasser wurde gleichfalls mit einigen Tropfen obiger Phenolphtaleïnlösung versetzt und nochmals sterilisiert. Gelatine und Peptonwasser beimpfte ich mit Bacillus fluorescens liquefaciens und bewahrte einige Röhrchen der rot gefärbten Gelatine und des Peptonwassers zur Kontrolle auf. Nach 2 resp. 3 Tagen waren die geimpften Gelatine- und Peptonwasserröhrchen entfärbt, die Kontrollröhrchen jedoch noch rot. Zusatz von 1 Tropfen Natronlauge färbte aber die beimpften und durch das Bakterium entfärbten Nährböden wieder ebenso stark rot als sie es ursprünglich waren. Auch noch nach

8 Tagen gelang dieser Versuch. Es ist also hierdurch bewiesen, daß Phenolphtaleïn durch das reduzierende Ferment des Bacillus fluorescens liquefaciens nicht verändert und nicht etwa, wie sich annehmen ließe, zu Phtalin reduziert wird.

Ich will hier noch auf den Umstand hinweisen, daß die Entfärbung von größeren Mengen gebrauchsfertiger Lunge-Zeckendorff'scher Lösung durch Bakterienwirkung sehr lange Zeit in Anspruch nimmt.

Schon in Fläschchen von 150 ccm Inhalt, die ganz mit dem Reagens gefüllt sind, dauerte es mehrere Wochen, bis die Entfärbung bemerkbar war. Es ist dies durch die erforderliche CO_2-Menge erklärlich, die hier außerordentlich viel größer ist, als für die nur ca. 10—15 ccm enthaltenden Proberöhrchen.

Um nun zu prüfen, ob die sterilisierte und nicht entfärbte Lösung auch wirklich unverändert und zum praktischen Gebrauch noch tauglich geblieben wäre, verglich ich den Inhalt 14 Tage alter Röhrchen, welche ihre Färbung unverändert gehalten hatten, mit einer frisch bereiteten Gebrauchslösung und zwar, da es sich, wie schon früher erwähnt, um die Frage der praktischen Verwendbarkeit handelte, mittels des Luftprüfers in der Weise, daß ich feststellte, ob die zur Entfärbung der beiden Vergleichslösungen nötigen Luftquanta dieselben wären. Zur Vermeidung von Versuchsfehlern, die sich wegen des stets wechselnden Kohlensäuregehaltes der Zimmerluft leicht hätten bemerkbar machen können, machte ich die Untersuchungen mit den beiden Lösungen zur selbigen Zeit und an selbiger Stelle mittels zweier Luftprüfer.

Die Lufteinsaugeöffnungen beider Apparate wurden dicht bei einander befestigt und mußte deshalb unter allen Umständen gleichartige Luft in beide Gebläse eingesaugt werden. Ferner wurden die Gummiballons beider Apparate auf gleichen Rauminhalt geprüft. In das Fläschchen des einen Apparates goß ich die zu prüfende Flüssigkeit, in dasjenige des anderen die Kontrolllösung. Es wurden jedesmal mindestens zwei Bestimmungen gemacht und dabei regelmäßig die Apparate gewechselt, so daß einmal die Kontrollflüssigkeit sich in einem, ein andermal im anderen Apparate befand. Die Resultate dieser Versuche s. Tabelle p. 8.

Um der Frage näherzutreten, ob auch Stammlösungen sich längere Zeit gebrauchsfähig erhalten, prüfte ich eine solche, die aus dem Jahre 1897 stammte und einen Gehalt von Phenolphtaleïn von 1,0 g pro Liter aufwies. Dieselbe war rotbraun gefärbt. Aus ihr hatte ich eine Hefenart und einen Schimmel gezüchtet. Erstere schwamm in Form kleiner Inseln auf der Flüssigkeit, letzterer befand sich auf dem Grunde der Lösung. Schimmel und Hefen waren nur äußerst spärlich nachweisbar, Bakterien keine. Das aus der Lösung hergestellte verdünnte Reagens war bräunlich gefärbt und ließ die eingetretene Endreaktion nicht deutlich erkennen, da die Flüssigkeit hierbei nicht farblos, sondern gelblich wurde.

Zweitens untersuchte ich in gleicher Weise eine Lösung aus dem Jahre 1896. Gehalt an Phenolphtalein 0,1 g pro Liter.

Die Lösung war nur noch blaßrot, das daraus gewonnene verdünnte Reagens fast farblos, konnte jedoch mit etwas stark verdünnter alkoholischer Phenolphtaleinlösung wieder aufgefärbt werden und hatte dann genau die Farbe der aus frischer Stammlösung bereiteten Gebrauchslösung.

Die Resultate der Versuche sind in folgender Tabelle (p. 8) zusammengestellt.

Art der Lösung	Zahl der zur Entfärbung nötigen Füllungen	Zahl d. erforderlichen Füllungen bei der Vergleichslösung
Sterilisierte Lösung	9 (810) [1]	9 (810) [1]
„ „	8 (720)	6 (540)
„ „	6 (540)	6 (540)
Geimpfte, noch nicht entfärbte Lösung	5 (450)	7 (630)
	6 (540)	7 (630)
Stammlösung von 1897 mit 1,0 g Phenolphtaleïn pro Liter	7 (630)	9 (810)
	5 (450)	7 (630)
Stammlösung von 1896; 0,1 g Phenolphtaleïn pro Liter enthaltend (wurde mit alkohol. Phenolphtaleïn aufgefärbt)	7 (630)	7 (630)
	5½ (495)	5½ (495)
	6 (540)	6 (540)

Aus diesen Versuchen geht Folgendes hervor. Die aus dem Jahre 1897 stammende braunrot verfärbte Stammlösung ist verdorben. Da es mir nicht bekannt ist, wie oft diese Flasche geöffnet wurde, so können aus dieser Prüfung keine Schlüsse gezogen werden, ob die Lösung an sich nicht haltbar sei, oder ob etwa die in derselben vorhandenen Pilze eine Veränderung hervorgebracht hätten. Die Lösung vom Jahre 1896 war aber noch in ursprünglicher Stärke, trotzdem ihre Farbe, wie schon vorhin erwähnt, blaßrot geworden war.

Die sterilisierte Gebrauchslösung hatte ebenfalls brauchbare Resultate ergeben. Daß die sterilisierte Lösung einmal einen Mehrverbrauch von 2 Füllungen aufwies, ist augenscheinlich einem Versuchsfehler zuzuschreiben, da es ausgeschlossen erscheint, daß sie um soviel stärker geworden sein könnte. Sonst zeigte die sterilisierte Lösung keine Unterschiede gegenüber der frisch zubereiteten.

Was die beimpfte, aber noch nicht vollständg entfärbte Lösung anbetrifft, so war dieselbe erheblich schwächer geworden.

Faßt man alle vorstehend erwähnten Versuchsresultate zusammen, so ergeben sich folgende Schlußfolgerungen.

I. Es ist erwiesen, daß durch die Einwirkung von zur Fluorescens-Gruppe gehörenden Bakterien eine Entfärbung der verdünnten Lunge-Zeckendorff'schen Lösung herbeigeführt werden kann [2]).

II. Durch Sterilisation können die eventuell in der Lösung vorhandenen Bakterien abgetötet und dadurch eine für den praktischen Gebrauch genügende Haltbarkeit derselben herbeigeführt werden.

III. Hat die Stammlösung unter Umständen eine sich auf mehrere Jahre erstreckende, also für die Praxis mehr als ausreichende Haltbarkeit.

---

1) Die eingeklammerten Zahlen geben die Menge der durch das Reagens getriebenen Luft in Kubikcentimeter an.

2) Die eingangs erwähnte Beobachtung an Lösungen, die durch Aufbewahrung entfärbt worden sind, sich aber nach Zusatz von Phenolphtaleïn wieder färbten, steht allerdings hiermit nicht in Einklang und beweist, daß auch der Farbstoff zerstört werden kann. Indes ist nicht ausgeschlossen, daß hier eine Lichtwirkung mit im Spiele war.

Eine Entfärbung derselben kann ohne Bakterienwirkung durch Veränderung des Farbstoffes herbeigeführt werden, was aber auf die praktische Verwendbarkeit keinen Einfluß ausübt.

Oxalsäurelösungen.

Daß verdünnte, wässerige Lösungen von Oxalsäure ihren Titre ändern, d. h. mit der Zeit schwächer werden, oder selbst ihre Acidität ganz verlieren, ist schon seit langem bekannt. Man schrieb diese Veränderung der Einwirkung des Lichtes zu und findet auch deshalb häufig die Vorschrift, Oxalsäurelösungen zur Titrieranalyse im Dunkeln aufzubewahren und dadurch vor Zersetzung zu schützen.

Nach Richardson[1]) zersetzt sich wässerige Oxalsäurelösung unter der Einwirkung des Lichtes und des Sauerstoffs zu CO_2 und H_2O_2. Bei ungenügendem Sauerstoffzutritt aber zu CO_2 und H_2O.

Bizio[2]) hat schon in den Jahren 1870 und 1883 diesen Vorgang des Schwächerwerdens obiger Lösung beobachtet und als einfache Oxydation erklärt.

Mit diesen Angaben steht nicht im Einklang, daß einige ältere Autoren kein CO_2 in den zersetzten Lösungen fanden.

Es sind auch Vorschläge gemacht worden, durch Zusätze die spontane Zersetzung der Oxalsäurelösungen zu verhindern, so von E. Riegler[3]), welcher vorschlug, diese Lösung durch Zusatz von Schwefelsäure haltbar zu machen. Natürlich ist ein solcher Zusatz nur bei der Titration mit Kaliumpermanganat statthaft und nicht bei der Alkalimetrie.

Prof. Treadwell[4]) macht einige Angaben über die Haltbarkeit von Oxalsäurelösungen mit und ohne Zusatz von Schwefelsäure; dieselben sind in folgender Tabelle zusammengestellt.

	Wässerige Oxalsäurelösung	Schwefelsäurehaltige Oxalsäurelösung
frisch	1000 ccm = 1000,6 ccm $\frac{N}{10}$-Lösung	1000 ccm = 1002,5 ccm $\frac{N}{10}$-Lösung
nach 8 Monaten	1000 ccm = 994,9 ccm $\frac{N}{10}$-Lösung	1000 ccm = 1001,8 ccm $\frac{N}{10}$-Lösung

Die schwefelsäurehaltige Lösung hatte also in 8 Monaten 1,2 Promille, die wässerige dagegen 5,6 Promille an Wirkungswert eingebüßt.

Wittstein[5]) hat $2^1/_2$ Monate lang (April, Mai und Juni) in weißen, hermetisch verschlossenen Gefäßen 5-proz. Oxalsäurelösung dem Lichte exponiert. Nach Ablauf obiger Zeit enthielt die Lösung nur noch 4,643 Proz. Säure. Wittstein erwähnt noch Arbeiten von Döbereiner, Ebelmann, Draper, Niepce und Corvisart, ferner die von Seekamp, welche jedoch, da es sich hierbei nicht um reine Oxalsäurelösungen handelt, übergehen werden können.

Während in diesen Arbeiten nur von einer Einwirkung des Lichtes die Rede ist, hat doch schon frühzeitig die Beobachtung des Auftretens von Schimmelmycel in solchen zersetzten Oxalsäurelösungen die Vermutung nahegelegt, daß es sich um eine Wirkung der Pilze handeln könne.

---

1) Berichte 27 Refer. 496.
2) Ref. Jahresbericht. 1870. p. 643; Ref. Zeitschr. f. analyt. Chemie. Bd. IX. p. 392.
3) Zeitschr. f. analyt. Chemie. 1896. p. 522.
4) Lehrb. d. analyt. Chemie. Bd. II. p. 401/402.
5) Vierteljahrsschr. f. prakt. Pharmacie. Bd. XI. p. 573.

W. Gerland[1]) empfiehlt den Zusatz von einem Krystall Thymol, welches weder bei der Alkalimetrie noch bei der Einstellung gegen Permanganat störend wirken soll. Er scheint also wohl an die Möglichkeit einer Mikrobenwirkung gedacht zu haben.

Werner[2]) macht hierüber weitere Mitteilungen. Er arbeitete mit einer Lösung von 0,4 g Oxalsäure im Liter (ca. $^1/_{150}$ Normal) und fand, daß diese Lösung innerhalb 6 Wochen ihre Acidität verlor. Es hatte sich Schimmelmycel am Boden der Flasche gebildet. Kohlensäure war nicht zugegen. Da bezüglich Belichtung der Lösung nichts angegeben ist, so nehme ich an, daß dieselbe dem diffusen Licht ausgesetzt war.

In der gleichen Zeitschrift teilt Blass[3]) einige Beobachtungen über den gleichen Gegenstand mit. Auch er arbeitete mit der stark verdünnten Lösung von 0,4 zu 1000. Nach einem Jahre reagierte diese nicht mehr sauer und enthielt Pilzflocken, die am Boden der Flasche lagen. Im übrigen war die Flüssigkeit klar geblieben. Die Schimmelbildung war im Verhältnis zu der vom Verf. in anderen organischen Säuren beobachteten so gering, daß er nicht annehmen kann, daß diese geringe Schimmelmenge die Oxalsäure zersetzt resp. aufgezehrt haben könnte. Aus der beigegebenen Abbildung eines mikroskopischen Präparates geht nicht mit Sicherheit hervor, um welchen Pilz es sich gehandelt hat; jedenfalls nicht um Penicillium.

Fleury[4]) fand Oxalsäurelösungen, welche 4—6 dg Säure pro Liter enthielten, nach längerer Zeit unter Bildung einer enormen Menge „kryptogamischer Vegetation“ zersetzt. Eine Lösung von 6,3 g pro Liter blieb unverändert. Verf. ist der Ansicht, daß nur die stark verdünnte Lösung ein Nährmittel für Pilze sei.

In vorstehend erwähnten Arbeiten wurde nur das Vorkommen von Pilzmycelien in wässeriger Oxalsäure erwähnt, ohne daß eigentliche Kulturversuche von Schimmelpilzen in genannter Säure unter analytischer Kontrolle der letzteren vorliegen.

Solche teilt Carl Wehmer[5]) mit. Seiner sehr umfangreichen und interessanten Arbeit entnehme ich die folgenden Angaben, welche sich auf die Zersetzlichkeit wässeriger Oxalsäurelösungen im Lichte und im Dunkeln aufbewahrt beziehen und daher für meine Untersuchung von besonderem Interesse sind.

Verf. erwähnt die Arbeit von O. Warburg, welcher gezeigt hat, daß Pilzdecken, auf Lösungen von freier Oxalsäure gebracht, den Säuregehalt derselben allmählich zerstören.

Wehmer zeigt, daß freie Oxalsäure unter gewissen Bedingungen selbst für widerstandsfähige Pilze ein Gift ist, sobald ihre Konzentration eine gewisse Grenze überschreitet. Setzt man die Konzentration herab, so kann die Säure selbst als Nährstoff (aber als schlechter) z. B. von Penicillium verwertet werden. Aus vergleichenden Versuchen mit Oxalsäurelösungen verschiedener Stärke im Dunkeln und am Lichte zieht Verf. den Schluß, daß eine spontane Säurezersetzung bei Lichtabschluß nicht stattfindet, selbst wenn sich einige Pilzflocken gebildet hatten.

In den belichteten Lösungen war der Säuregehalt merklich heruntergegangen und in mehreren ganz verschwunden. Die Versuchsdauer er-

1) Ref. Chem. Centralbl. 1870. Bd. I. p. 470.
2) Archiv d. Pharmacie. 1873. p. 523.
3) Archiv d. Pharmacie. 1873. p. 310.
4) Ref. Chem. Centralbl. 1883. p. 547.
5) Entstehung und physiologische Bedeutung der Oxalsäure im Stoffwechsel einiger Pilze. (Botan. Zeitung. 1891. No. 15 u. ff.)

streckte sich auf einen Zeitraum von 97 bis 370 Tagen. Die Lösungen standen teils in offenen Kolben, teils waren sie durch Watte verschlossen. Da in einigen der unverschlossenen Gefäße Pilzflocken aufgetreten waren, ein regelmäßiger Unterschied in der Säureabnahme dieser und der steril gebliebenen Lösungen aber nicht bemerkbar war, so schließt Verf., daß dem Lichte bei der Zersetzung der wässerigen Oxalsäurelösung die Hauptwirkung zuzuschreiben ist und die Pilze nur eine nebensächliche Rolle spielen.

Er bemerkt ferner ausdrücklich als eigenartiges Resultat, daß selbst die in Bezug auf Verschluß, Aufbewahrung etc. gleich behandelten Lösungen keine gleichmäßige Veränderung zeigten. Diese Versuche sind ohne Zusatz von Nährflüssigkeit gemacht. Verf. betont jedoch, daß eine Zersetzung der Säure im Stoffwechsel der Pilze wohl möglich ist, wenn noch ein Nährmittel zugegen. Für solche Versuche bezeichnet er Penicillium als am geeignetsten. Bringt man jüngere Decken von genanntem Pilze auf $^1/_2$-proz. Lösungen von Oxalsäure, so ist nach einiger Zeit die Gesamtmenge der Säure verschwunden. Zu bemerken ist, daß bei den erwähnten Versuchen die Lösungen im Dunkeln gehalten wurden. Um widersprechende Angaben in der Litteratur klarzustellen, hat W. P. Jorissen[1]) einige Versuche über Schimmelpilzwirkung auf Oxalsäure-Normallösungen angestellt. Hierbei zeigte sich, daß $^1/_1$-Normaloxalsäure im Dunkeln während 101 Tagen ihren Säuregehalt nicht verminderte (sie wurde etwas stärker), im Lichte dagegen stark an Acidität einbüßte. $^1/_{10}$- und $^1/_{100}$-Normallösung ohne eingeimpfte Pilze hielten sich im Dunkeln 75 Tage lang ebenfalls konstant (der Vergleichsversuch mit belichteten Säuren fehlt). 0,01 Normalsäure mit einem Zusatz von Schimmelpilzen veränderte sich im Dunkeln. Dieser Versuch wurde 2mal angestellt. 1mal verschwand die Säure ganz in 56 Tagen, beim anderen Versuche fand Abnahme der Acidität von ca. $6^1/_2$ Proz. in 75 Tagen statt.

Das Verhalten von 0,1-Normalsäure + Schimmel wurde nicht untersucht. Ebenso sind keine Versuche mit belichteten und zugleich mit Schimmelpilzen beimpften Lösungen erwähnt. Es folgen nun noch solche mit Zusätzen von Hemmungsmitteln zur beimpften Säure. Bei der von Riegler empfohlenen Zugabe von 5 Proz. H_2SO_4 konnte Verf. eine Stabilität der beimpften Lösungen im Dunkeln konstatieren. Dieses Resultat ist zu erwarten gewesen, denn in einer 5-proz. Schwefelsäure dürfte eine Schimmelvegetation wohl ausgeschlossen sein.

Ein Zusatz von 1 Promille Borsäure hielt die Zersetzung von beimpften Lösungen (im Dunkeln) nicht auf.

Eine Lösung, welcher 2 g Borsäure pro Liter zugesetzt war, blieb stabil.

Verf. schließt folgendes aus seinen Versuchen.

Wässerige Oxalsäurelösungen halten sich ohne Schimmel im Dunkeln unverändert; bei Anwesenheit dieser Pilze werden sie zersetzt.

Zusatz von 5 Proz. H_2SO_4 konserviert die Lösungen.

1-promill. Borsäure hat keine Wirkung.

2-promill. Borsäure wirkt nach Jorissen nur in der Kälte konservierend auf Oxalsäurelösungen ein.

Was die Methode der von Jorissen ausgeführten Impfung anbetrifft, so sagt er hierüber folgendes:

1) Die Stabilität von Oxalsäurelösungen. (Zeitschr. f. angewandte Chemie. 1899. p. 523.)

„Diese Schimmelpilze waren kultiviert auf frischem Weizen- und Roggenbrot und wurden vorsichtig davon abgehoben, ohne Brot mitzunehmen."

Davon, daß die Schimmelrasen vor der Uebertragung auf die Säure ausgewaschen wurden, ist nichts erwähnt.

Bei dieser Art der Beimpfung ist es aber nicht zu vermeiden, daß kleine Mengen Nährstoffe mit in die zu beimpfende Lösung übergeführt werden; ganz abgesehen davon, daß solche, auf vorzüglichen Nährböden gewachsene Myceldecken eine gewisse Menge Nährmaterial aufgespeichert haben und eine Zeit lang weiter wachsen können. Von Warburg und Wehmer ist aber gezeigt worden, daß die Anwesenheit von Nährstoffen auf die Zerstörung der Oxalsäure durch Schimmelpilze von wesentlichem Einfluß ist. Ich glaubte daher diese Versuche gerade für die im praktischen Gebrauche so wichtige $^1/_{10}$-Normalsäure unter möglichster Ausschließung dieses Einflusses wiederholen zu sollen, um so mehr als derselbe bei der spontanen Infektion der Lösungen in der Praxis eine Mitübertragung von Nährstoffen nicht oder nur in höchst geringem Maße stattfindet. Eine im Laboratorium befindliche Flasche mit $\frac{N}{10}$-Oxalsäurelösung, die längere Zeit nicht benutzt worden war und die im diffusen Lichte gestanden hatte, zeigte sich fast frei von Säure. (10 ccm derselben verbrauchten nur noch 1,6 ccm $^1/_{10}$-N-Natronlauge). Am Boden dieser Flasche lag eine große Menge Mycelflocken.

Von diesem Mycel brachte ich nun in eine mit $^1/_{10}$-N-Oxalsäure (zu $^2/_3$) gefüllte Flasche. Dieselbe war mit Glasstopfen verschlossen. In einer anderen gleichen Flasche hob ich einen Teil der gleichen Lösung zur Kontrolle auf.

Nach 21 Tagen zeigten sich folgende Veränderungen:

Art der Lösung	Verbrauch an $\frac{N}{10}$-Lauge		Veränderung
	am 13. Juni	am 4. Juli	
1) Nicht geimpft	9,952	9,950	0,02 Proz. Säureverlust
2) Geimpft	9,952	9,03	9,3 „ „

Hierauf hob ich die Mycelstücke mittels eines Platindrahtes aus der veränderten Lösung II und brachte sie in bisher steril gewesene Säurelösung. Der Laugenverbrauch für 10 ccm Säure wurde nochmals mit 9,950 ccm bestimmt.

Am 15. Juli, also 12 Tage später, war der Verbrauch an Natronlauge nur noch 9,60 ccm; in Prozenten ausgedrückt, also ein Verlust von 3,5 Proz. zu konstatieren. Ich will bemerken, daß die Lösungen im Halbdunkel standen und niemals von direktem Sonnenlicht getroffen wurden.

Am 28. September prüfte ich wieder mit der gleichen Natronlauge. Es verbrauchten 10 ccm der Säure jetzt nur noch 7,8 ccm Lauge, entsprechend einer Abnahme von $21^1/_2$ Proz., während eine Lösung ohne Schimmel, am gleichen Orte aufbewahrt, nur 3,5 Proz. an Acidität verloren hatte.

Vorstehende Versuche können ihrer geringen Zahl wegen nun selbstverständlich nicht als ausschlaggebend angesehen werden, und setzte ich daher dieselben in größerem Maßstabe fort. Dabei war ich bestrebt, immer solche Bedingungen einzuhalten, wie sie bei dem natürlichen Auftreten von Schimmelpilzen in Oxalsäurelösungen bestehen.

Ich sah daher darauf, daß bei der Verimpfung nur untergetauchtes Mycel zur Anwendung kam, weil nach meinen eigenen und den mir bekannten Beobachtungen Anderer beim spontanen Auftreten von Mycelium in Oxalsäure niemals auf der Flüssigkeit schwimmend angetroffen wird.

Ferner mußte ein Miteinbringen von fremden Nährstoffen thunlichst ausgeschlossen werden. Weil nun aber die mir zur Verfügung stehende Menge des in Oxalsäurelösung gewachsenen Pilzmateriales für meine ferneren Versuche nicht ausreichte, war ich genötigt, dasselbe durch Kultivierung zu vermehren. Als Nährmaterial wählte ich Bierwürze. Nachdem eine genügende Bildung von Mycel in derselben stattgefunden hatte, nahm ich dieses heraus und züchtete es bei 25° C in $^1/_{10}$-Normaloxalsäure weiter. Letztere ersetzte ich mehrere Male durch neue. Es geschah dies, um die löslichen Nährstoffe aus dem Mycel auszuwaschen und die eventuell in demselben aufgespeicherten Nährstoffe aufbrauchen zu lassen. Erst dann impfte ich mit demselben meine Lösungen.

Was Herstellung und Aufbewahrung der Normallösungen anbetrifft, so bemerke ich, daß dieselben aus einer gereinigten Säure hergestellt wurden. Nach der Auflösung in destilliertem Wasser wurden die Lösungen $^3/_4$—1 Stunde im Dampftopfe 1mal sterilisiert. Alle zur Aufbewahrung dienenden Gefäße wurden vorher im Trockenschranke bei 160° C unter Watteverschluß keimfrei gemacht. Ich will hier bemerken, daß ich bei späteren Versuchen auch die zum Verschlusse dienenden Korke, in Schreibpapier eingewickelt, mitsterilisierte. Stieg die Temperatur nicht erheblich über 160° C, so blieben Korke und Papier unversehrt, ging dieselbe jedoch stark über die angegebene Höhe, so wurden die Korke braun und spröde und brachen dann beim Eindrehen in den Flaschenhals leicht ab.

Zur Titrestellung wurde eine aus Natriumalkoholat und kohlensäurefreiem Wasser bereitete $^1/_{10}$-Normalnatronlauge angewendet. Dieselbe bewahrte ich in einer mit Abfüllvorrichtung und Natronkalkverschluß versehenen Flasche auf, so daß eine spätere Aufnahme von CO_2 durch die Lösung verhindert wurde. Als Indikator diente Phenolphtaleïn. Zur Abmessung der Titreflüssigkeit wurden stets die gleichen Geräte benützt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die Ergebnisse der Versuche mit Oxalsäure zusammengestellt.

Die Temperaturen wurden bei A und B mittels Maximal- und Minimalthermometers bestimmt (s. Tabelle p. 14).

Wie aus der nachstehenden Tabelle zu entnehmen ist, haben sich bis auf 3 alle dem Lichte exponierten Lösungen zersetzt. Gleichviel, ob sie vorher sterilisiert waren oder nicht. Es stimmt dies also im großen und ganzen mit den Resultaten überein, die Jorissen und Wehmer erhalten haben. Mit der Beobachtung des erstgenannten Autors deckt sich auch meine Erfahrung, die ich mit in größerer Anzahl im Dunkeln aufbewahrten, geimpften Lösungen gemacht habe. Hier hatte ich eine Stabilität der ungeimpften und sterilen und eine Abnahme des Säuregehaltes bei den mit Schimmelpilzen beimpften Lösungen zu verzeichnen. Wie ferner aus der Tabelle hervorgeht, ist bei meinen Versuchen jedoch bei Lichtabschluß die Veränderung eine geringere gewesen.

Einen Unterschied zwischen sterilisierten und nicht sterilisierten Lösungen ohne Schimmel konnte ich nicht bemerken. Im Brütschranke

Veränderung der Oxalsäurelösungen.

Datum des Anfanges und des Endes des Versuches	Beschaffenheit der Lösung	Verbrauch an $\frac{N}{10}$-Lauge in ccm zu Anfang des Versuches	Verbrauch an $\frac{N}{10}$-Lauge in ccm zu Ende des Versuches	Veränderung	Beobachtungszeit in Tagen
A. Lösungen im diffusen Licht am Fenster aufbewahrt. Temperatur 9—16° C.					
4. Okt. 1901 — 6. Nov. 1901	sterilisiert, nicht geimpft	11,0	10,7	Abnahme v. ca. 3,0 Proz.	33
4. „ 1901 — 6. „ 1901	desgl.	11,0	10,99	„ „ „ 0,1 „	33
24. „ 1901 — 18. Dez. 1901	nicht sterilisiert, nicht geimpft	10,1	10,02	„ „ „ 0,8 „	55
20. „ 1901 — 18. „ 1901	geimpft	10,01	9,11	„ „ „ 9,0 „	59
20. „ 1901 — 18. „ 1901	nicht geimpft	9,985	9,82	„ „ „ 1,6 „	59
24. „ 1901 — 18. „ 1901	„ „	10,10	10,1	„ keine	55
24. „ 1901 — 18. „ 1901	„ „	10,10	10,1	„ „	55
4. Nov. 1901 — 18. „ 1901	sterilisiert	10,06	10,06	„ „	44
4. „ 1901 — 18. „ 1901	„	10,07	9,98	„ v. ca. 0,9 „	44
24. Okt. 1901 — 18. „ 1901	geimpft mit Pilzdecke	9,99	1,06	„ „ „ 89,0 „	55
24. „ 1901 — 23. Jan. 1902	desgl.	9,99	0,34	„ „ „ 89½ „	91
12. Dez. 1901 — 14. „ 1902	sterilisiert	9,40	9,31	„ „ „ 96½ „	33
12. „ 1901 — 14. „ 1902	geimpft	9,38	9,30	„ „ „ 0,8 „	33
12. „ 1901 — 14. „ 1902	„	9,38	8,13	„ „ „ 12,0 „	33
B. Bei Lichtabschluß aufbewahrt. Temperatur 12—15° C.					
20. Okt. 1901 — 18. Dez. 1901	geimpft	10,0	9,40	Abnahme v. ca. 6,0 Proz.	59
20. „ 1901 — 18. „ 1901	„	10,0	9,79	„ „ „ 2,0 „	59
24. „ 1901 — 18. „ 1901	nicht geimpft, nicht sterilisiert	10,1	10,1	„ keine	55
24. „ 1901 — 18. „ 1901	sterilisiert	10,12	10,12	„ „	55
1. Nov. 1901 — 18. „ 1901	nicht sterilisiert nicht geimpft	10,16	10,16	„ „	47
1. „ 1901 — 18. „ 1901	„ „	10,16	10,155	„ v. ca. 0,05 „	47
4. „ 1901 — 18. „ 1901	sterilisiert	10,09	10,09	„ keine	44
4. „ 1901 — 18. „ 1901	„	10,05	10,095	+ 0,45 „	44
12. Dez. 1901 — 14. Jan. 1902	„	9,40	0,39	„ v. ca. 0,1 „	33
12. „ 1901 — 14. „ 1902	geimpft	9,38	9,31	„ „ „ 0,7 „	33
12. „ 1901 — 14. „ 1902	„	9,38	9,21	„ „ „ 1,7 „	33
1. Febr. 1902 — 22. Juni 1902	sterilisiert	10,795	unverändert	„ „ „ 0,1 „	132
1. „ 1902 — 22. „ 1902	„	10,795			
1. „ 1902 — 22. „ 1902	geimpft (sehr wenig Mycel)	10,60	10,59		
C. Lösungen bei 25° C dunkel aufbewahrt (Brütschrank).					
20. Okt. 1901 — 18. Dez. 1901	geimpft	10,0	9,57	Abnahme v. ca. 4,3 Proz.	59
20. „ 1901 — 18. „ 1901	„	9,925	9,51	„ „ „ 4,1 „	59
20. „ 1901 — 18. „ 1901	nicht geimpft	9,915	10,01	„ keine	59
20. „ 1901 — 18. „ 1901	„ „	10,0	10,035	„ „	59
1. Nov. 1901 — 18. „ 1901	„ „	10,16	10,16	„ „	47
1. „ 1901 — 18. „ 1901	„ „	10,16	10,16	„ „	47
4. „ 1901 — 18. „ 1901	sterilisiert	10,06	10,06	„ „	44
4. „ 1901 — 18. „ 1901	„	10,07	10,11	„ „	44
4. „ 1901 — 18. „ 1901	„	10,05	10,14	„ „	44
12. Dez. 1901 — 14. Jan. 1902	„	9,395	9,380	„ v. ca. 0,15 „	33
12. „ 1901 — 14. „ 1902	„	9,40	9,40	„ keine	33
12. „ 1901 — 14. „ 1902	geimpft	9,38	8,3	„ v. ca. 10,0 „	33
12. „ 1901 — 14. „ 1902	„	9,38	8,91	„ „ „ 4,7 „	33

bei einer konstanten Temperatur von 25 ° C war im allgemeinen eine stärkere Abnahme der Acidität bei den beimpften Lösungen zu verzeichnen. Wenn man erwägt, daß obige Temperatur das Optimum für den zu den Versuchen benützten Schimmelpilz darstellt und außerdem chemische Zersetzungen aller Art bei erhöhter Temperatur schneller verlaufen, so hat dieses Resultat nichts Auffälliges. Faßt man die obigen Resultate zusammen, so ist zu sagen, daß auch bei meinen Versuchen der Lichtwirkung der Hauptanteil bei der Zersetzung zuzuschreiben ist; daß jedoch unter Umständen auch bei Lichtabschluß eine merkbare Zersetzung durch Schimmelpilze stattfinden kann und daß bei höherer Temperatur diese Zersetzung eine stärkere ist.

Natriumthiosulfatlösung.

In der Jodometrie findet das Natriumthiosulfat ausgedehnte Anwendung und zwar meistens als $\frac{n}{10}$-Lösung.

Ueber die geringe Haltbarkeit dieser Titreflüssigkeit sind viele Angaben gemacht worden; die hierzu von verschiedenen Seiten gegebenen Erklärungen übergehe ich, da sie die bakteriologische Seite der Frage nicht berühren.

Es werden Zusätze empfohlen, um die Lösung von unterschwefligsaurem Natron haltbarer zu machen, so z. B. Ammonkarbonat. Nach den Angaben von Prof. Treadwell[1]) ist dieser Zusatz jedoch eher geeignet, die Lösung schneller zersetzlich zu machen.

Nach genanntem Autor verändert sich eine Natriumthiosulfatlösung allerdings in den ersten 8—14 Tagen infolge der Einwirkung von CO_2. Nach dieser Zeit ist jedoch die im destillierten Wasser vorhandene Kohlensäure aufgebraucht und der Titre bleibt konstant. Eine Lösung, deren Jodverbrauch nach 2 Monate langem Stehen pro Kubikcentimeter = 0,011673 g betrug, verbrauchte nach weiteren 8 Monaten 0,011667 g Jod pro Kubikcentimeter. Diese Lösung hatte sich also praktisch nicht verändert.

Bornträger[2]) spricht unter Hinweis auf die Angaben F. Mohr's, welcher schon früher einen Zusatz von Salicylsäure zur Haltbarmachung chemischer Lösungen vorgeschlagen hatte, die Vermutung aus, daß auch der Titre bei Thiosulfatlösung durch Mikroben beeinflußt werden könne. Bornträger setzte zu einer Natriumthiosulfatlösung, deren Stärke jedoch nicht angegeben ist, pro Liter eine Messerspitze voll Salicylsäure.

Während 6 Wochen kontrollierte er alle 2—3 Tage den Titre dieser Lösung mittels Jod, welches er aus 20 ccm Jodkalilösung mit schwefliger Säure und Schwefelsäure frei machte und mit Schwefelkohlenstoff ausschüttelte. Die Konzentration ist bei keiner Lösung angegeben.

Der Verbrauch für diese 20 ccm Jodkalilösung war anfänglich 11,3 ccm, stieg auf 12,8, fiel wieder auf 11,0 und betrug zuletzt 12,2 ccm. Trotzdem diese Schwankungen bedeutende sind, ist Verf. der Ansicht, daß dieselben hier geringer gewesen seien, als es in Lösungen ohne Zusatz der Fall sei. In der mit Salicylsäure versetzten Lösung hatten sich lange, weiße Fäden ausgeschieden, über deren Natur keine Angaben gemacht werden.

---

1) Lehrbuch d. analyt. Chemie. Bd. II. p. 429 u. 430.
2) Zeitschr. f. analyt. Chemie. Bd. XXVII. p. 641—642.

Ich bemerke, daß auf Zusatz der von Bornträger angegebenen und auch von mir angewendeten Salicylsäuremengen zu $^1/_{10}$ N-Natriumthiosulfatlösung eine starke Schwefelausscheidung eintritt. Nach einigen Tagen hat sich jedoch der Niederschlag fest auf den Boden der Flasche angesetzt und ist die Lösung dann klar und kann titriert werden.

Von 2 in Gebrauch befindlichen Thiosulfatlösungen untersuchte ich Proben bakteriologisch und fand in einer Lösung Bacillus fluorescens liquefaciens vor.

Ich dachte daher an die Möglichkeit einer Einwirkung dieser Bakterienart auf obige Lösung und suchte dies durch den Versuch festzustellen. Zu diesem Zwecke verteilte ich $^1/_{10}$ N-Natriumthiosulfatlösung auf 3 Flaschen, sterilisierte im Dampfkochtopfe und beimpfte nach dem Erkalten 2 Flaschen mit Bac. fluor. liquef., indem ich eine geringe Menge einer Agar-Fluorescenskultur überimpfte. Nach 53 Tagen prüfte ich wieder. Es zeigten sich folgende Veränderungen:

Art der Lösung	Ursprüngl. Verbrauch an Thiosulfatlösung	Verbrauch nach 53 Tagen	Veränderung
Beimpft	9,77 ccm	9,74 ccm	+ 0,3 Proz.
Beimpft	9,865 „	9,78 „	+ 0,8½ „
Steril	9,745 „	9,745 „	—

Durch die Plattenmethode konnte ich feststellen, daß beide geimpfte Lösungen Bac. fluor. liquef. enthielten, während die 3. Lösung frei von Bakterien war.

Dieser eine Versuch berechtigt nun noch nicht zu bestimmten Schlüssen und wiederholte ich denselben daher in größerem Maßstabe.

Ich will vorausschicken, daß ich den Titre mit Jod stellte, das aus Jodkaliumlösung mittels Kaliumbichromat in saurer Lösung frei gemacht war. Als Indikator diente Stärkelösung. Das angewandte unterschwefligsaure Natron war frei von schwefliger und Schwefelsäure, das Jodkalium jodsäurefrei.

Zur Lösung verwendete ich kohlensäurefreies, destilliertes Wasser. Der Titre wurde erst einige Tage nach Herstellung der Lösung bestimmt. Zur Beimpfung diente eine geringe Menge einer Agarkultur. Die Thiosulfatlösung befand sich in 16 mit Glasstopfen versehenen $^1/_2$-Literflaschen, die zu $^4/_5$ gefüllt waren. Davon wurden 8 Flaschen durch Kochen im Dampfkochtopfe sterilisiert und die Hälfte von diesen letzteren mit Bacillus fluorescens liquefaciens beimpft; die übrigen steril aufbewahrt. Von den 8 nicht sterilisierten Flaschen wurden 4 mit der früher angegebenen Menge Salicylsäure (1 Messerspitze pro Liter) versetzt und die übrigen ohne weitere Zusätze aufbewahrt.

In Betreff der Temperatur, bei welcher die Aufbewahrung der Lösung erfolgte, ist zu bemerken, daß von den 4 im übrigen gleich behandelten Flaschen immer je 2 bei einer Temperatur von 21—23° C, die anderen im Laboratorium in der Nähe des Fensters bei 9—17° C aufgestellt wurden.

Nach 43 Tagen wurde der Jodverbrauch der Lösungen wieder bestimmt. Es war aber kein regelmäßiger Unterschied zwischen den mit Bacillus fluorescens liquefaciens beimpften Lösungen und den steril gebliebenen zu bemerken, indem erstere teilweise konstant geblieben waren, von den

sterilen sich aber einige verändert hatten. Bei den mit Salicylsäure versetzten Lösungen war der Jodverbrauch bei den bei Zimmertemperatur aufbewahrten Flaschen etwas zurückgegangen, die Lösung also schwächer geworden. Bei den bei 21—23° C aufbewahrten Lösungen war ein Stärkerwerden zu bemerken. Aus diesen Resultaten geht somit nicht mit Bestimmtheit hervor, daß der Bacillus fluorescens liquefaciens bei der Titreveränderung der Natriumthiosulfatlösung mitwirkte.

Zu den vorstehenden Versuchen benutzte ich das im Laboratorium vorhandene — im großen hergestellte — destillierte Wasser. Es ist jedoch immerhin nicht ausgeschlossen, daß dieses Wasser für so leicht zersetzbare Körper, wie Natriumthiosulfat, nicht rein genug war, indem es Spuren von Säuren oder Fetten enthalten könnte.

Ich setzte deshalb die Versuche unter Berücksichtigung dieser Punkte fort, indem ich die $\frac{n}{10}$-Lösung mit aus Glasgefäßen im Laboratorium destilliertem Wasser bereitete.

Die Lösungen wurden auf 10 absolut reine Glasflaschen verteilt und vor Licht geschützt aufbewahrt, nachdem sie 1 Stunde lang im Dampfe sterilisiert worden waren.

Nach Ablauf von 8 Tagen stellte ich den Titre fest und impfte 6 Flaschen mit Bac. fluor. liquef. 4 Flaschen ließ ich zwecks Kontrolle steril. Hierauf kittete ich die Glasstopfen luftdicht mittels Paraffin zu.

Nach 130 Tagen titrierte ich die Lösungen wieder und konnte ich wiederum keinen Unterschied zwischen den sterilen und geimpften Lösungen finden[1]).

Kulturversuche ergaben in allen beimpften Flaschen das Vorhandensein von Bac. fluor. liquef.

Ich war genötigt, die Versuche mit dieser Lösung vorläufig abzubrechen. Ich möchte noch bemerken, daß in den beimpften Lösungen, in denen eine Veränderung zu bemerken war, diese letztere nicht durch Kohlensäureatmung der eingebrachten Mikroben hervorgebracht sein kann, da ich in diesen Lösungen keine schweflige Säure nachweisen konnte, welche aber bei einer Einwirkung von Kohlensäure hätte entstehen müssen. Es könnte unter Umständen an eine Veränderung durch das jodreduzierende Ferment des Bacillus fluorescens liquefaciens gedacht werden, welches bei der Titration ein Stärkerwerden der Lösung vortäuschen könnte. Da aber die Fermentbildung mit dem Wachstume der Bakterien gleichen Schritt hält und es sich hier des spärlichen Nährbodens wegen nur um ein sehr geringes Wachstum handeln kann, so dürfte wohl eine Mitwirkung des Bacillus fluorescens liquefaciens an der Veränderung des Titres von Natriumthiosulfatlösung ausgeschlossen sein und wären die Schwankungen des Titres genannter Lösung in rein chemischen Ursachen zu suchen.

Nur das Eine geht aus meinen Versuchen mit Sicherheit hervor, nämlich daß eingeimpfte Bakterien in $\frac{n}{10}$-Natriumthiosulfatlösungen lange Zeit lebensfähig bleiben können.

---

1) Ich will hier bemerken, daß sowohl zur Abmessung der Lösungen als auch zur Titration stets dieselben geaichten Buretten benutzt wurden und in dieser Hinsicht ein Versuchsfehler mir ausgeschlossen erscheint.

Salzsäure.

Ueber das Vorkommen von Schimmel oder Bakterien in $^1/_{10}$-Normalsalzsäure und etwa durch dieselbe hervorgebrachten Veränderungen habe ich keine Angaben in der bakteriologischen Litteratur auffinden können. Ich hatte schon früher Gelegenheit, das Vorkommen von Schimmelmycel in obiger Lösung zu beobachten und zwar war damals eine deutlich sichtbare Menge Schimmel in einer halbgefüllten Literflasche aufgetreten. Als ich im Laufe meiner Arbeit Gelegenheit hatte, eine solche infizierte Salzsäure untersuchen zu können, stellte es sich heraus, daß es sich um eine Form des Penicillium glaucum handelte. In fraglicher Lösung waren 3 Mycelflocken vorhanden. Es zeigte sich, daß jede derselben eine Faser umhüllte, die irgendwie in die Flüssigkeit gelangt war.

Vielleicht hatten diese Fasern dem Schimmel Nährstoff geboten. Im Verhältnis zur Flüssigkeitsmenge war die Mycelmasse äußerst gering. Das früher bestimmte Titre der Lösung hatte sich in ca. 6 Monaten nur äußerst wenig verändert. Da es nun erwiesen war, daß Schimmelmycel in $^1/_{10}$ N-Salzsäure wachsen kann, so suchte ich eine eventuelle Einwirkung auf den Titre diese Säure zu untersuchen. Daß es sich hierbei nicht, wie bei der Oxalsäure, um einen direkten Verbrauch der Säure im Stoffwechsel des Pilzes handeln konnte, ist klar; es wäre aber möglich gewesen, daß letzterer dennoch einen Einfluß auf die Acidität der Lösung hätte ausüben können.

Ich füllte deshalb eine größere Menge $\frac{n}{10}$-Salzsäure in mit Glaspfropfen versehene Flaschen ein. Das lösliche Alkali der Glaswand war hier vollständig entfernt worden.

Zur Titrestellung verwendete ich reine, bis zum konstanten Gewichte geglühte Soda; als Indikator Methylorange.

Zur Impfung konnte ich hier nicht direkt in Säure gewachsenes Pilzmycel benutzen, da das in der $^1/_{10}$ N-Lösung vorgefundene nicht ausreichte. Es wurden daher Kulturen in (resp. auf) Bierwürze angelegt und das erhaltene Mycelium ca. 14 Tage lang in $\frac{n}{10}$-Salzsäure eingelegt, um auch hier die Nährstoffe auszuwaschen. Die Lösung wurde öfters gewechselt.

Dann erst wurde der Schimmel zur Impfung verwendet und nach geschehener Impfung der Titre der Lösungen bestimmt.

Die Flaschen wurden zu $^3/_4$ gefüllt und hierauf mit Paraffin hermetisch verschlossen. Nachdem die Säure ca. 7 Wochen gestanden hatte, bestimmte ich den Titre abermals, doch war keine der Pilzwirkung zuzuschreibende Veränderung in den geimpften Flüssigkeiten zu bemerken, trotzdem in einem Teile derselben deutliches Wachstum des Schimmels zu konstatieren war. Nirgends war letzterer abgestorben. Diese Versuche zeigen uns also, daß in $\frac{n}{10}$-Salzsäure Schimmelpilze nicht nur längere Zeit lebensfähig bleiben, sondern sogar wachsen können, ohne den Titre merkbar zu beeinflussen.

Ich werde nicht ermangeln, die Lösung nach geraumer Zeit wieder auf solche Veränderungen zu prüfen und möchte mit der vorliegenden Arbeit auch Andere veranlassen, titrierte $\frac{n}{10}$- oder $\frac{n}{100}$-Salzsäuren, in

denen Schimmelpilze gefunden werden, auf die Erhaltung des Titres zu prüfen.

Was die Praxis anbetrifft, so wird es vorderhand allerdings das Richtigste sein, deutlich verschimmelte Salzsäurelösungen — wie dies wohl auch bisher jeder sorgfältige Analytiker gethan haben dürfte — zu beseitigen.

Die Resultate aus vorliegender Arbeit lassen sich, wie folgt, zusammenfassen:

I. Durch die Einwirkung gewisser Bakterien kann eine Entfärbung des verdünnten, zur Lunge-Zeckendorff'schen Luftprüfung benutzten Reagenses herbeigeführt werden.

Durch Sterilisation und absolut luftdichten Verschlusse kann selbst der verdünnten Lösung eine für die praktische Verwendung hinreichende Haltbarkeit gegeben werden.

II. Wässerige Oxalsäurelösungen können durch Pilzmycelien selbst im Dunkeln eine Veränderung erleiden.

Sterilisierte, im Dunkeln aufbewahrte Lösungen sind haltbar.

III. Der zuweilen in $\frac{n}{10}$-Natriumthiosulfatlösungen sich vorfindende Bacillus fluorescens liquefaciens hat keinen wesentlichen Einfluß auf die Stabilität des Titres obiger Lösung.

IV. Schimmelpilze vermögen unter Umständen in $\frac{n}{10}$-Salzsäure spärlich weiterzuwachsen. Eine Veränderung des Titres der Säure konnte durch die allerdings nicht abschließenden, in dieser Richtung angestellten Versuche nicht nachgewiesen werden.

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 2433

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena. — 2433